(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年1月4日(04.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/005121 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2021.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/024120

(22) 国際出願日： 2023年6月29日(29.06.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-106330 2022年6月30日(30.06.2022) JP

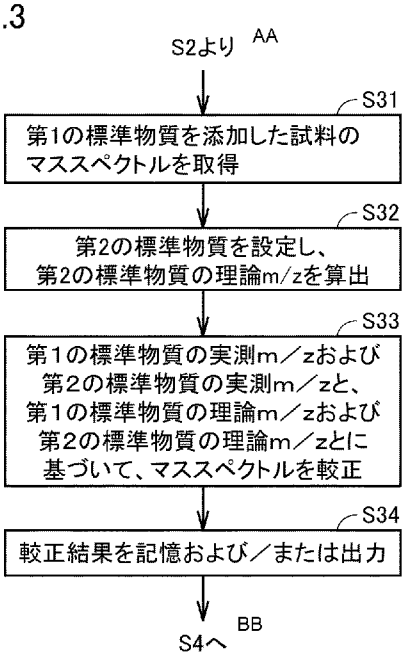
(71) 出願人: 株式会社島津製作所 (**SHIMADZU CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 Kyoto (JP). 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 (**OSAKA INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH**) [JP/JP]; 〒5370025 大阪府大阪市東成区中道１丁目３番３号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 児嶋 浩一 (**KOJIMA, Koichi**); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 若林 友騎 (**WAKABAYASHI, Yuki**); 〒5370025 大阪府大阪市東成区中道１丁目３番３号 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所内 Osaka (JP). 西嶋 駿弥 (**NISHIJIMA, Shunya**); 〒5370025 大阪府大阪市東成区中道１丁目３番３号 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所内 Osaka (JP). 坂田 淳子 (**SAKATA, Junko**); 〒5370025 大阪府

(54) **Title:** CALIBRATION METHOD, ANALYSIS METHOD, CONTROL DEVICE, AND ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称： 較正方法、分析方法、制御装置および分析装置

FIG.3



S31Acquire mass spectrum of sample to which first standard substance has been added
S32Set second standard substance, and calculate theoretical m/z of second standard substance
S33Calibrate mass spectrum on basis of actually measured m/z of first standard substance, actually measured m/z of second standard substance, theoretical m/z of first standard substance, and theoretical m/z of second standard substance
S34Store and/or output calibration result
AA From S2
BB To S4

(57) **Abstract:** This calibration method is for calibrating a mass spectrum for mass spectrometry of a microbial sample containing a substance to be analyzed, i.e. molecules to be analyzed, said calibration method including: a step (S31) of acquiring a mass spectrum of a microbial sample to which one or more molecules having an estimated theoretical m/z smaller than that of the substance to be analyzed have been added as a first standard substance; a step (S32) of setting, as a second standard substance, one or more molecules which are derived from the microbial sample and have an estimated theoretical m/z larger than that of the substance to be analyzed; and a step (S33) of calibrating the mass spectrum on the basis of an actually measured m/z of the first standard substance and an actually measured m/z of the second standard

WO 2024/005121 A1

［続葉有］

大阪市東成区中道１丁目３番３号 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人：弁理士法人深見特許事務所(FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.)；〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目２番４号 中之島フェスティバルタワー・ウエスト Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

substance as indicated by peaks on the mass spectrum, the theoretical m/z of the first standard substance, and the theoretical m/z of the second standard substance.

(57) 要約：分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正方法であって、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子を、第１の標準物質として添加した、微生物試料のマススペクトルを取得するステップ（Ｓ３１）と、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定するステップ（Ｓ３２）と、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質の理論ｍ／ｚとに基づいて、マススペクトルを較正するステップ（Ｓ３３）とを含む。

明　細　書

発明の名称 ： 較正方法、分析方法、制御装置および分析装置

技術分野

[0001] 本発明は、較正方法、分析方法、制御装置および分析装置に関し、より特定的には、質量分析法に関する較正方法、分析方法、制御装置および分析装置に関する。

背景技術

[0002] 分析対象となる分子である対象物質をイオン化し、その質量を質量分析法により分析する場合、対象物質の質量を高い精度で測定することが求められる。たとえば、分子量数千Ｄａの高分子を測定する場合に数Ｄａ以下の質量値の差を区別することが求められる場合がある。したがって、測定精度を上げるために、組成から質量の理論値が算出可能な標準物質の質量を実測し、当該標準物質における質量の実測値と理論値との差に基づいて、質量分析装置の較正が行なわれている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２０１９－９０６５４号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 微生物を対象として質量分析を行なう場合には、一般には、大腸菌から調整された既知の分子を標準物質として質量分析装置の較正が行なわれる。しかし、一般に用いられる最も分子量が小さい標準物質でも質量電荷比（ｍ／ｚ）が約４３００であるため、これより小さい分子が対象物質である場合には、外挿となって精度が下がる。

[0005] 特許文献１（特開２０１９－９０６５４号公報）には、その対策として、大腸菌由来の試料に含まれるアスパラギン酸－１－デカルボキシラーゼ（ｍ／ｚ約２８００）を標準物質として用いた較正方法が開示されている。しか

し、この方法も、大腸菌以外では、アスパラギン酸－１－デカルボキシラーゼを有するとは限らず、分子量も同じであるとは限らず、タンパク質が産生されるとも限らない。

[0006] よって、微生物の質量分析において、特に分子量の小さい分子を対象物質とする場合、新たな較正方法が求められていた。

[0007] 本開示は、かかる課題を解決するためになされたものであり、その目的は、マススペクトルにおける質量精度を向上することで、分析の精度を向上する。

課題を解決するための手段

[0008] 本開示の第１の局面に係る較正方法は、分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正方法であって、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子を、第１の標準物質として添加した、微生物試料のマススペクトルを取得するステップと、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定するステップと、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質の理論ｍ／ｚとに基づいて、マススペクトルを較正するステップとを含む。

[0009] 本開示の第２の局面に係る制御装置は、分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正を実行する制御装置であって、メモリと、プロセッサとを備える。メモリは、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である第１の標準物質の理論ｍ／ｚを記憶する。プロセッサは、第１の標準物質を添加した微生物試料のマススペクトルを取得する。プロセッサは、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定する。プロセッサは、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質とに基づいて、マススペクトルを較正する

。

[0010] 本開示の第３の局面に係る分析装置は、分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する分析装置であって、測定部と、メモリと、プロセッサとを備える。測定部は、微生物試料の測定データを取得する。メモリは、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である第１の標準物質の理論ｍ／ｚを記憶する。プロセッサは、第１の標準物質を添加した微生物試料のマススペクトルを測定データに基づいて取得する。プロセッサは、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定する。プロセッサは、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質とに基づいて、マススペクトルを較正する。

発明の効果

[0011] 本開示による較正方法によれば、添加した対象物質より理論ｍ／ｚが小さい第１の標準物質と、微生物試料に由来する対象物質より理論ｍ／ｚが大きい第２の標準物質とを用いて、これらの標準物質において理論ｍ／ｚと実測ｍ／ｚとの差が小さくなるようにマススペクトルを較正できる。これにより、対象物質の分子量が小さくても、当該分子量に対応する範囲のマススペクトルも適切に較正される。よって、マススペクトルにおける質量精度を向上することで、分析の精度を向上することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本実施の形態に係る分析装置の構成を示す概略図である。

[図2]本実施の形態に係る分析方法を説明するフローチャートである。

[図3]本実施の形態に係る較正方法を説明するフローチャートである。

[図4]本実施の形態に係る較正方法を実施する前のマススペクトルの一例を示す図である。

[図5]図４のマススペクトルが示す対象物質のｍ／ｚの誤差を示す図表である。

[図6]図４のマススペクトルに対し、本実施の形態に係る較正方法を実施した後のマススペクトルの一例を示す図である。

[図7]図６のマススペクトルが示す対象物質のｍ／ｚの誤差を示す図表である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に、本発明の実施の形態について図面を参照して詳細に説明する。なお、以下では図中の同一または相当部分には同一の符号を付して、その説明は原則的に繰返さないものとする。

[0014] ［１．分析装置の構成］

図１は、本発明の実施の形態に係る分析装置１の構成を示す概略図である。分析装置１は、試料に含まれる物質の質量分析を行なうための質量分析装置であり、たとえば、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry）である。

[0015] 本実施の形態において、試料は、生物由来の試料である生物試料である。一実施例において、試料は微生物由来の試料である。試料には、分析対象の分子である対象物質、および、マススペクトルの較正に用いられる分子である標準物質（キャリブラント）が含まれる。また、本実施の形態において、分析装置１における分析は、マススペクトルのピークを検出し、試料に含まれる特定または非特定の物質のｍ／ｚを測定することを含む。一実施例において、当該物質はタンパク質である。分析装置１における分析は、当該マススペクトル上のピークが示すｍ／ｚ（以下、「実測ｍ／ｚ」とも称する）に基づいて、試料中に特定の物質が含まれるか否かを判別すること、試料中の特定の物質の濃度を算出すること、および試料中に含まれる生物を同定することを含んでもよい。

[0016] 図１を参照して、分析装置１は、制御部１０および測定部２０を含む。

測定部２０は、高電圧により試料中の物質（タンパク質）をイオン化し、当該イオンＳをｍ／ｚに相関する飛行時間に応じて分離したのち検出する。測定部２０は、イオン化部２１と、イオン加速部２２と、質量分離部２３と

、検出部２４とを備える。図１において、測定部２０におけるイオンＳの移動を矢印Ａ１で模式的に示す。

[0017] イオン化部２１は、試料中の物質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）法によりイオン化する。イオン化の方法としては、ＭＡＬＤＩ法以外にもエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ：Electrospray ionization）法等の任意のソフトイオン化法を用いることができる。ＥＳＩ法によりイオン化を行なう場合、分析装置１が液体クロマトグラフをさらに備え、液体クロマトグラフで分離された試料中の物質をイオン化部２１がイオン化する構成にすると、高い分離能を得ることができるため好ましい。

[0018] イオン化部２１は、試料プレートを支持する試料プレートホルダ（図示せず）と、試料プレート上にレーザー光を照射するレーザー装置（図示せず）を含むイオン源を含む。試料プレートに試料が配置された後、試料にマトリックスが添加され、試料が乾燥させられる。その後、試料プレートはイオン化部２１の真空容器内の試料プレートホルダに設置される。マトリックスの種類は特に限定されないが、タンパク質試料を効率よくイオン化する観点からシナピン酸またはα－シアノ－４－ヒドロキシケイ皮酸（ＣＨＣＡ）等を用いることが好ましい。

[0019] イオン化部２１は、試料プレートが設置された真空容器を減圧した後、レーザー光を試料プレート上の各試料に照射して順次イオン化を行なう。レーザー光を照射するレーザー装置の種類は、選択したマトリックスに吸収される光を発振することができれば特に限定されず、たとえばマトリックスがシナピン酸またはＣＨＣＡを含む場合には、Ｎ２レーザー（波長３３７ｎｍ）等を好適に用いることができる。イオン化部２１でイオン化されたイオンＳは、図示しない引出電極等による電場により引き出され、イオン加速部２２に導入される。

[0020] イオン加速部２２は、加速電極２２１を備え、導入されたイオンＳを加速させる。加速されたイオンＳの流れは、図示しないイオンレンズにより適宜収束されて質量分離部２３に導入される。

[0021] 質量分離部２３は、フライトチューブ２３１を備え、それぞれのイオンＳがフライトチューブ２３１の内部を飛行する際の、飛行時間の違いによりイオンＳを分離する。図１ではリニア型のフライトチューブ２３１が示されているが、リフレクトロン型やマルチターン型等でもよい。試料に含まれるイオンＳを分離して検出することができれば、質量分析の方法は特に限定されない。

[0022] 検出部２４は、マルチチャンネルプレート等のイオン検出器を備え、質量分離部２３で分離されたイオンＳを検出し、検出部２４に入射したイオンの数に応じた強度の検出信号を出力する。検出部２４から出力された検出信号は、制御部１０の処理部１１に入力される。図１において、測定部２０の検出部２４からのイオンＳの検出信号の流れを矢印Ａ２で模式的に示す。

[0023] 制御部１０は、処理部１１、記憶部１２および入出力部１３を含む。制御部１０は、本開示における「制御装置」の一実施例に対応する。

[0024] 処理部１１は、ＣＰＵ等のプロセッサを含んで構成され、分析装置１を制御する動作の主体として機能する。処理部１１は、記憶部１２等に記憶されたプログラムを実行することにより各種処理を行なう。処理部１１は、本開示における「プロセッサ」の一実施例に対応する。

[0025] 処理部１１は、装置制御部１１１と、マススペクトル作成部１１２と、マススペクトル分析部１１３と、較正部１１４とを備える。

[0026] 装置制御部１１１は、後述する入力部１３１から入力された分析条件に関するデータに基づいて、測定部２０の動作を制御する。図１においては、装置制御部１１１による測定部２０の制御を矢印Ａ３で模式的に示す。

[0027] マススペクトル作成部１１２は、検出部２４が検出したイオンの検出量と、当該イオンの飛行時間とを含む測定データから、飛行時間をｍ／ｚ値に換算し、各ｍ／ｚ値に対応する検出量を示すマススペクトルを作成する。

[0028] マススペクトル分析部１１３は、マススペクトルにおいて、マススペクトルのピークを検出する。検出したピークに対応するｍ／ｚを算出する。マススペクトル分析部１１３は、タンパク質データベースに基づいて、当該マス

スペクトル上のピークが示す実測ｍ／ｚが対応する物質を判別する。すなわち、マススペクトル分析部１１３は試料に含まれる特定または非特定の物質の実測ｍ／ｚを算出できる。マススペクトル分析部１１３は、さらに、実測ｍ／ｚに基づいて試料中に特定の物質が含まれるか否かを判別したり（試料中の成分同定）、試料中の特定の物質の濃度を算出したり、試料中に含まれる生物を同定したりしてもよい。より一般的には、マススペクトル分析部１１３は、試料中に含まれる物質の構造解析を行ってもよい。

[0029] 較正部１１４は、標準物質の実測ｍ／ｚおよび理論ｍ／ｚに基づいてマススペクトルを較正する。理論ｍ／ｚは、一般に計算値、理論値、理論ｍ／ｚ値とも称される値であり、分子量、付加したイオンおよび電荷数を考慮して算出される、理論的な質量と電荷数の比である。質量分析における較正とは、標準物質の実測ｍ／ｚが理論ｍ／ｚに近づくように補正すること、および、その補正をスペクトル全体に適用することである。較正処理の詳細は後述する。

[0030] 記憶部１２は、不揮発性の記憶媒体を備える。記憶部１２は、理論ｍ／ｚ値、マススペクトル作成部１１２が作成したマススペクトル、測定部２０から出力された測定データおよび処理部１１が処理を実行するためのプログラム等を記憶する。記憶部１２は、本開示における「メモリ」の一実施例に対応する。

[0031] 入出力部１３は、分析装置１が外部と情報を入出力するためのインターフェイスである。入出力部１３は、入力部１３１、出力部１３２および通信部１３３を含む。

[0032] 入力部１３１は、マウス、キーボード、各種ボタンおよび／またはタッチパネル等の入力装置を含んで構成される。入力部１３１は、測定部２０の動作の制御に必要な情報、および処理部１１の行なう処理に必要な情報等を、ユーザから受け付ける。

[0033] 出力部１３２は、液晶モニタ等の表示装置、プリンター等を含んで構成される。出力部１３２は、測定部２０の測定に関する情報や、処理部１１の処

理の結果等を、表示装置に表示したり、紙媒体に印刷したりする。

[0034] 通信部１３３は、インターネット等の無線や有線接続により通信可能な通信装置を含んで構成される。通信部１３３は、処理部１１の処理に必要なデータを受信したり、判別結果等の処理部１１が処理したデータを送信したり、適宜必要なデータを送受信する。

[0035] 上記した制御部１０の機能の一部または全部は、測定部２０とは物理的に離れた電子計算機、サーバー等に配置してもよい。

[0036] ［２．従来の較正方法］

近年、ＭＡＬＤＩ法を用いた質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＭＳ）による微生物の同定法が急速に普及している。その理由は、ＭＡＬＤＩ－ＭＳは、従来の同定法である培養法などに比べて熟練された技術を必要せず、低コストで迅速に行えるからである。また、従来の同定法は、属名などの微生物に関する、ある程度の「予想」に基づいて各種の試験を行なうことから、その「予想」ができなければ試験、すなわち同定の試みさえも不可能であった。これに対して、質量分析法による微生物の同定法は、質量分析用の試料が調製できる程度の菌体を用意できれば、「予想」はできなくても同定を試みることは可能という意味でも画期的な方法である。すなわち、ＭＡＬＤＩ－ＭＳにおいては、従来の同定法に比べ、簡便に微生物の同定を試みることができる。

[0037] 一方で、ＭＡＬＤＩ－ＭＳを用いた微生物同定においては菌体をほとんど精製せずに試料とすることから、タンパク質を精製して行なう通常のＭＡＬＤＩ－ＭＳの場合に比べて、試料の量および試料に含まれる物質の種類が多く、そのために多くのピークが乱立してマススペクトルが複雑になる、試料の盛り上がりなどが原因の１つとなってｍ／ｚの誤差が大きくなるなどの問題が生じ得る。この誤差は、ある１つのマススペクトルピークが、微生物のどの分子に由来するかという分析をする場合に特に深刻な問題となり得る。

[0038] このような質量分析法における誤差を軽減するために、質量較正（mass calibration）は極めて重要な作業である。質量分析法においては、質量較正

により、マススペクトルのｍ／ｚ精度を担保できる。これにより、上記したようなマススペクトルを利用した成分の同定、微生物の同定および構造解析の適切な実行が可能になる。

[0039] よく知られているように、質量較正方法には、大別して、内部標準法と外部標準法とがある（特許文献１等参照）。内部標準法においては、対象物質を含む試料に標準物質が混合され、測定される。すなわち、対象物質と標準物質は同時に同じ条件で測定される。その結果得られたマススペクトルにおいて、標準物質の理論ｍ／ｚと実測ｍ／ｚとの差に基づいて、マススペクトルのｍ／ｚ軸が較正され、対象物質の実測ｍ／ｚ値も較正される。

[0040] 一方、外部標準法においては、対象物質を含む試料と標準物質を含む較正用の試料（以下、「較正用試料」と称する）とが混合されずに、各々測定される。まず、較正用試料のマススペクトルにおいて、標準物質の理論ｍ／ｚと実測ｍ／ｚとの差の情報を得る。次に、その情報を利用して、対象物質を含む試料のマススペクトルを較正し、対象物質の実測ｍ／ｚ値を較正する。このような外部標準法においては、対象物質を含む試料の測定と、標準物質を含む較正用試料の測定とにおける測定条件のばらつきの影響を補正することが困難である。そのため一般に、外部標準法よりも、内部標準法においてより精度の高い質量較正が行なわれる。

[0041] 上述したように、質量分析を実行する際の較正は極めて重要であり、可能であれば内部標準較正法を適用したい。しかし、現実的には様々な技術的な制限、コスト的な制約などの理由で、外部標準較正が行われることが一般的である。一方で、高い精度が求められる場合には、それらの制限や制約の中で様々な解決方法が模索されている。

[0042] 微生物を対象にして質量分析を行なう場合には、一般には、よく研究されている既知の大腸菌から調製した物質を標準物質として用いる外部標準法による較正が行なわれる。しかし、大腸菌由来の標準物質では、もっとも分子量が小さいもの（リボソームタンパク質の１つ）でもｍ／ｚ約４，３００であり、これより小さい分子が対象物質である場合には、外挿となって、精度

が下がる恐れがある。

[0043] その対策として、大腸菌由来の試料を測定する場合に、大腸菌由来の新しい標準物質として、アスパラギン酸－１－デカルボキシラーゼ（ｍ／ｚ約２，８００）を使う方法などもある（特許文献１）。しかし、大腸菌以外の微生物がアスパラギン酸－１－デカルボキシラーゼを持つとは限らず、アミノ酸配列も同じとは限らず、タンパク質が産生されるとも限らない。

[0044] 更なる工夫として、低分子量の標準物質と高分子量の標準物質とを分析対象の試料に加えてマススペクトルを測るという方法がある。しかし、単純にこれらの標準物質を加えただけでは、高分子量の多価イオンが、測定対象のｍ／ｚ範囲に現れることが多く、対象物質のマススペクトルが得られないという問題が生じる場合がある。

[0045] これらの課題を鑑みて、本実施の形態に係る質量分析装置においては、まず、分子量が既知であり、対象物質より分子量の小さい１以上の分子を第１の標準物質として試料に添加し、試料のマススペクトルを測定する。次に、試料由来の対象物質より分子量の大きい１以上の分子を第２の標準物質として設定する。そして、試料のマススペクトルが示す第１の標準物質に対応する実測ｍ／ｚと、第２の標準物質に対応する実測ｍ／ｚとを、第１の標準物質に対応する理論ｍ／ｚと、第２の標準物質に対応する理論ｍ／ｚとに対応するように、マススペクトルを較正する。この様にして較正されたマススペクトルのｍ／ｚは質量精度が向上し、それらのマススペクトルを用いた分析の精度も向上する。よって、本実施の形態に係る質量分析装置においては、以上のような簡易な較正方法により、質量精度を向上することで、分析の精度を向上することができる。

[0046] ［３．本実施の形態に係る分析方法］

図２は、本実施の形態に係る分析方法を説明するフローチャートである。図２に示すステップは、分析装置１およびユーザによって実行される。なお、図中において、「Ｓ」は「ＳＴＥＰ」の略称として用いられる。

[0047] Ｓ１において、ユーザは、第１の標準物質を試料に添加して、試料を調製

する。第１の標準物質は、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である。たとえば、分析装置１における分析の目的が試料に含まれる微生物の同定である場合、この場合の対象物質である微生物の同定において参照される物質のｍ／ｚは、一般的に約３，０００～１５，０００である。よって、この場合の第１の標準物質のｍ／ｚは、約３０００未満であることが望ましく、さらに好ましくは約１５００未満である。第１の標準物質は、たとえば、タンパク質またはペプチドである。より具体的な例としては、第１の標準物質は、アンギオテンシン２（分子量：１，０４６．２）および／またはアンギオテンシン１（分子量：１２９６．５）である。しかし、第１の標準物質は、これに限定されず、たとえば、ブラジキニンフラグメント１－７（ｈｕｍａｎ）（分子量：約７５７．４）、Ｐ１４Ｒ（ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｐｅｐｔｉｄｅ）（分子量：約１５３３．９）、ＡＣＴＨフラグメント１８－３９（ｈｕｍａｎ）（分子量：約２４６５．２）、酸化型インスリンＢ鎖（ｂｏｖｉｎｅ）（分子量：約３４９４．７）の少なくとも１つを含んでもよい。

[0048] 一実現例において、第１の標準物質の理論ｍ／ｚは、第１の標準物質のアミノ酸配列から分子量を求め、当該分子量に基づいて理論ｍ／ｚを算出することで推定される。理論ｍ／ｚは、たとえば、分子量に水素原子の質量１．０８を加算することで簡略的に推定される。第１の標準物質の理論ｍ／ｚまたは分子量は、第１の標準物質の理論ｍ／ｚまたは分子量を含むデータベースがある場合、当該データベースから取得してもよい。

[0049] Ｓ２において、ユーザは、分析装置１において、較正用試料を用いて一般的な質量分析装置の較正を行なう。較正用試料は、一般的には複数の標準物質を含む試料であり、質量分析装置の較正用として販売されているものを用いてもよい。なお、較正用試料は、第１の標準物質および第２の標準物質を含んでも、含まなくてもよい。

[0050] なお、Ｓ２における較正用試料による較正は、質量分析装置において対象物質を測定する前に一般的に行なわれる較正であるが、分析装置１が適切に

調整・管理されている場合には必ずしも必要ではない。

[0051] Ｓ３において、ユーザは、分析装置１において、Ｓ１において調整した試料のマススペクトルを測定し、第１の標準物質および試料に由来する第２の標準物質で当該マススペクトルを較正する。第２の標準物質は、試料に含まれる微生物に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子である。第２の標準物質は、たとえば、タンパク質である。Ｓ３における処理の詳細については、図３において詳述する。

[0052] Ｓ４において、ユーザは、分析装置１を用いて、較正したマススペクトルに基づいて対象物質を分析する。

[0053] Ｓ５において、ユーザは、Ｓ４における分析結果を分析装置１に記憶および／または表示させる。これにより、ユーザは分析結果を容易に保存および／または認識することができる。

[0054] ［４．本実施の形態に係る較正方法］

図３は、本実施の形態に係る較正方法を説明するフローチャートである。図３に示されるＳ３１～Ｓ３４は、図２のＳ３に対応する処理である。図３に示す各ステップは、分析装置１の処理部１１において実施される。

[0055] Ｓ３１において、処理部１１は、第１の標準物質を添加した試料のマススペクトルを取得する。ユーザおよび／または処理部１１は、Ｓ３１において、マススペクトルの測定開始前に、マススペクトルの測定条件を設定してもよい。たとえば、マススペクトルを測定する質量範囲は、第１の標準物質のｍ／ｚを含むように設定される。その他のマススペクトルの測定条件は、明瞭なスペクトルが得られるように適宜設定される。

[0056] Ｓ３２において、処理部１１は、第２の標準物質を設定する。第２の標準物質としては、たとえば、リボソームタンパク質が設定される。微生物のリボソームタンパク質はＭＡＬＤＩで明瞭に観察される場合が多く、また、アミノ酸配列も多くの場合はＵｎｉＰｒｏｔなどの公開データベースで調べることが可能であり、アミノ酸配列から分子量、さらに理論ｍ／ｚを算出することは容易である。そのため、試料に含まれる微生物が既知または予想され

ている場合は、当該微生物のリボソームタンパク質を第２の標準物質として設定することは有用である。

[0057] 第２の標準物質は、たとえば、ユーザによって入力部１３１を用いて設定される。ユーザによる設定は、たとえば、出力部１３２にマススペクトルが表示され、ユーザが入力部１３１を用いてマススペクトル中の所定のピークを選択すると、当該ピークに対応する分子が第２の標準物質として設定されることによって行なわれる。もしくは、ユーザによる設定は、たとえば、ユーザが入力部１３１を用いて第２の標準物質となる物質の情報を入力する、または、選択肢から選択することで行なわれてもよい。

[0058] なお、Ｓ３２における第２の標準物質の設定は、第２の標準物質の理論ｍ／ｚの推定を含む。一実現例において、第２の標準物質の理論ｍ／ｚは、第２の標準物質のアミノ酸配列から分子量を求め、当該分子量に基づいて理論ｍ／ｚを算出することで推定される。理論ｍ／ｚは、たとえば、分子量に水素原子の質量１．０８を乗算することで簡略的に推定される。第２の標準物質の理論ｍ／ｚまたは分子量は、第２の標準物質の理論ｍ／ｚまたは分子量を含むデータベースがある場合、当該データベースから取得してもよい。

[0059] Ｓ３３において、処理部１１は、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質とに基づいて、マススペクトルを較正する。

[0060] 処理部１１は、まず、マススペクトルから第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚを検出する。たとえば、処理部１１は、マススペクトルにおいて、第１の標準物質の理論ｍ／ｚから所定の誤差範囲に含まれるピークの実測ｍ／ｚを、第１の標準物質の実測ｍ／ｚと判定することで、第１の標準物質の実測ｍ／ｚを検出する。当該誤差範囲は、たとえば、予め数値として設定されている。第１の標準物質の実測ｍ／ｚの検出は、これに限定されず、当業者がマススペクトルを観察して、第１の標準物質の理論ｍ／ｚに対し所定の誤差範囲に含まれると判断したピークの実測ｍ／ｚ

を、第１の標準物質の実測ｍ／ｚとして判定してもよい。同様に、処理部１１は、第２の標準物質の実測ｍ／ｚを検出する。

[0061] 次に、処理部１１は、第１の標準物質に対応する分子のうち較正に用いる１以上の分子の選択を受け付ける。当該選択は、たとえばユーザが、マススペクトル上の当該分子に対応するピークを入力部１３１を用いて選択することで行なわれる。同様にして、処理部１１は、第２の標準物質に対応する分子のうち較正に用いる１以上の分子の選択を受け付ける。なお、選択された第１の標準物質に対応する１つ以上の分子を、以下「第１の分子」と称する。選択された第２の標準物質に対応する１つ以上の分子を、以下「第２の分子」と称する。

[0062] そして、処理部１１は、第１の分子の実測ｍ／ｚおよび第２の分子の実測ｍ／ｚと、第１の分子の理論ｍ／ｚおよび第２の分子の理論ｍ／ｚとに基づいて、マススペクトルを較正する。マススペクトルの較正は、たとえば以下のように行なわれる。

[0063] 第１の分子および第２の分子が各々１つの分子を含む場合、第１の分子の実測ｍ／ｚが第１の分子の理論ｍ／ｚとなるように、第２の分子の実測ｍ／ｚが第２の分子の理論ｍ／ｚとなるように較正される。そして、当該較正に応じて、マススペクトルにおけるｍ／ｚが線形に較正される。

[0064] 第１の分子および第２の分子の少なくとも一方が複数の分子を含む場合、各分子の実測ｍ／ｚが、対応する分子の理論ｍ／ｚに近づくように較正される。その一例としては、マススペクトルにおけるｍ／ｚが線形に較正されるという条件下で、これらの分子の各々の実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの誤差の２乗を全ての分子について加算した値が最小となるようにマススペクトルが較正される。すなわち、第１の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差の２乗、第２の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差の２乗の和が、小さくなるようにマススペクトルが較正される。その他の例としては、これらの分子の各々の実測ｍ／ｚが各々の理論ｍ／ｚとなるように較正され、これらの分子間の実測ｍ／ｚの値も線形に較正される。

[0065] なお、第１の標準物質および第２の標準物質に基づいて、マススペクトルを較正する方法については、以上の例に限定されず、第１の標準物質の実測ｍ／ｚが第１の標準物質の理論ｍ／ｚに近づくように、かつ、第２の標準物質の実測ｍ／ｚが第２の標準物質の理論ｍ／ｚに近づくように較正し、当該較正をスペクトル全体に適用する方法であればよい。すなわち、第１の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差と、前記第２の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差との、双方の差が小さくなるようにマススペクトルが較正されればよい。たとえば、標準物質を用いた較正方法として既に知られている方法のいずれか１つ、または、複数を組み合わせて使用してもよい。

[0066] Ｓ３４において、処理部１１は、必要に応じて、較正結果を記憶部１２に記憶する、および／または、出力部１３２から出力する。較正結果は、たとえば、較正後のマススペクトル、特定の物質における較正後の実測ｍ／ｚ、および、当該特定の物質における較正後の理論ｍ／ｚに対する実測ｍ／ｚの誤差の値の少なくとも１つを含む（たとえば後述する図６および図７）。これにより、ユーザは較正結果を容易に保存および／または認識することができる。なお、較正結果に、上記した指標の較正前のものが含まれている場合には、較正前後の効果が比較できる（たとえば後述する図４および図５）。

[0067] 図３に示すような、本実施の形態に係る較正方法によれば、添加した対象物質より理論ｍ／ｚが小さい第１の標準物質と、生物試料に由来する対象物質より理論ｍ／ｚが大きい第２の標準物質とを用いて、各々の標準物質において、実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差が小さくなるように較正される。そして、当該較正に応じて第１の標準物質の理論ｍ／ｚと第２の標準物質の理論ｍ／ｚとの間の理論ｍ／ｚを有する対象物質の実測ｍ／ｚも較正される。よって、質量分析装置における質量精度を向上することで、分析の精度を向上することができる。

[0068] この較正方法によれば、一般的な大腸菌から調整した物質を標準物質として用いる外部標準法に比べ、より小さい理論ｍ／ｚを有する第１の標準物質

を用いることで、より小さいｍ／ｚの範囲も適切に較正することができる。よって、対象物質が低分子である場合にも、精度よく分析を行なうことができる。

[0069] また、一般的な外部標準法においては、標準物質を含む較正試料を測定する際の条件に合わせて、試料を測定する際の条件を設定する必要があるが、本実施の形態に係る較正方法では、内部標準法を用いるので、その制約がない。よって、ユーザにおける測定条件の設定時の負担が軽減する。

[0070] また、Ｓ３２において、第２の標準物質の理論ｍ／ｚは、アミノ酸配列から算出される代わりに、内部標準法を用いて事前に実測した第２の標準物質の実測ｍ／ｚに基づいて推定されてもよい。具体的には、内部標準法を用いて第２の標準物質を事前に実測したときの実測ｍ／ｚを、本実施の形態における第２の標準物質の理論ｍ／ｚとしてもよい。内部標準法を用いて実測した実測ｍ／ｚは、外部標準法を用いて実測した実測ｍ／ｚに比べ、充分な精度である場合が多いので、このようにしても、本実施の形態における第２の標準物質の理論ｍ／ｚの正確性は充分である場合が多い。この方法は、アミノ酸配列が不明な場合等、理論ｍ／ｚが算出できない場合に有用である。当然ながら、この方法は、タンパク質以外の分子や翻訳後修飾などが加わった分子などでも適用できるので極めて有用である。

[0071] 図３に示すような、本実施の形態に係る較正方法は、第１の標準物質を添加した生物試料のマススペクトルを取得すれば実行できる。そのため、本分析装置１において、測定部２０は必須ではなく、制御部１０が外部から取得した当該マススペクトルに基づいて、本実施の形態に係る較正方法を実行してもよい。

[0072] また、図２～図３の各ステップのうち、ユーザが行なった作業および設定も、分析装置１が行なうように適宜自動化してもよい。たとえば、Ｓ１においてユーザが調整した試料を分析装置１に設置した際に、ユーザが対象物質の理論値ｍ／ｚを推定できる情報、第１の標準物質の理論値ｍ／ｚを推定できる情報、および、第２の標準物質の理論値ｍ／ｚを推定できる情報を分析

装置１に入力した上で、本実施の形態に係る較正方法を実行する指示を入力すれば、後のステップは分析装置１により自動で行なわれるように構成してもよい。

[0073] また、図２～図３で説明した各処理のうち、順番が前後しても効果が変わらない処理は順番を入れ替えて行なわれてもよいし、同時に行なわれても効果が変わらない処理は同時に行なわれてもよい。

[0074] ［５．実施例］

次に、本発明の効果を検証するために行なった実施例について説明する。

[0075] （５－１．対象物質の設定）

この実施例では、Ｅｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａのＡｃｉｄ Ｓｈｏｃｋタンパク質断片を対象物質にした。Ａｃｉｄ Ｓｈｏｃｋタンパク質は腸内細菌目に属する微生物のほとんどがその遺伝子を保有している。しかし、そのアミノ酸配列は属種によって大きく異なって多様性があり、更に、特定の配列で切断されて断片化すると考えられているが、研究途上で確定はしていない。また、発明者の研究により、腸内細菌目のＡｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎは糖を含む培地を用いると産生することが明らかにされている。このように分析対象に多様性があったり、不確定であったりする場合には、仮説から導き出される値、この場合は断片のアミノ酸配列から推定される理論ｍ／ｚと実測ｍ／ｚとの誤差をできるだけ小さくすることで、その仮説の正しさをより高めることができる。すなわち、対象物質に対応するマススペクトルピークの実測ｍ／ｚを、較正などによって、より高い精度で得る必要がある。

[0076] （５－２．培養条件）

Ａｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎをより多く産生させるために、Ｅｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａをＩＦＯ８０４培地（０．５％ハイポリペプトン、０．５％酵母抽出物、０．５％グルコース、０．１％硫酸マグネシウム）を用いて、一晩培養（１８時間）した。このようにしてＥｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａが増殖した懸濁液の１ｍＬを遠心し、上清を捨て

て微生物の沈渣を得て、更に精製水で沈渣を再懸濁し、再度遠心して上清を捨て、精製水で洗浄された沈渣を得た。この沈渣に１％のトリフルオロ酢酸溶液を加えて溶菌した。

[0077] （５－３．試料の調製）

当該溶菌液に、本実施の形態に係る分析方法の特徴の一つである、対象物質の理論ｍ／ｚよりも小さい理論ｍ／ｚを有する第１の標準物質として、アンギオテンシン１（分子量：１２９６．５、理論ｍ／ｚのｍ／ｚ１２９７．５）、アンギオテンシン２（分子量：１０４６．２、理論ｍ／ｚのｍ／ｚ１０４７．２）を終濃度が０．１ｐｍｏｌ／μＬになるように加えた。

[0078] 第１の標準物質が加えられた溶菌液と１０ｍｇ／ｍＬのα－シアノ－４－ヒドロキシケイ皮酸（ＣＨＣＡ）を等量混和し、その１μＬをＭＡＬＤＩのターゲットプレートに滴下、乾固してマススペクトル測定の試料とした。

[0079] （５－４．マススペクトルの取得）

前記の試料を質量分析装置（島津製作所製、ＭＡＬＤＩ－８０２０）にセットし、測定範囲をｍ／ｚ９００～１５，０００にセットしてポジティブリニアモードで測定し、図４に示すマススペクトルを得た。

[0080] 図４は、本実施の形態に係る較正方法を実施する前のマススペクトルの一例を示す図である。図４の下段には、ｍ／ｚ約１，０００から約６，０００の範囲のマススペクトルが示される。また、図４の上段には、ｍ／ｚ約１，８００から約２，０００の範囲のマススペクトルを拡大した図が示される。図４において、横軸は、ｍ／ｚに対応し、縦軸は信号強度の比率に対応する。また、各ピークの上方に付される数値はピークに対応するｍ／ｚを示す。また、Ｐ１１およびＰ１２は、アンギオテンシン２およびアンギオテンシン１に対応するピークを示す。Ｐ１３は、後述する第２の標準物質である、Ｅｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａの５０Ｓ ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌ３４に対応するピークを示す。Ｐ１～Ｐ７は、後述するＡｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎの７つの断片に対応するピークを示す。

[0081] 図５は、図４のマススペクトルが示す対象物質のｍ／ｚの誤差を示す表で

ある。図５は、対象物質のｍ／ｚの誤差を算出するために用いられた。発明者らの研究から、Ｅｒｗｉｎｉａ　ｐｅｒｓｉｃｉｎａのＡｃｉｄ　Ｓｈｏｃｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎは、７個の断片になると予想された。これらの７個の断片に「断片番号」１～７を割り振り、断片１～７に対応するアミノ酸配列を「アミノ酸配列」の列に示した。また、当該アミノ酸配列から推定された断片１～７の理論ｍ／ｚを「理論ｍ／ｚ」の列に記入した。そして、図４のマススペクトルにおいて、断片１～７に対応すると判定されたピークの番号Ｐ１～Ｐ７を、「ピーク番号」の列に記入した。そして、ピークＰ１～Ｐ７に対応するｍ／ｚを、「実測ｍ／ｚ」の列に記入した。さらに、実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの誤差を、「誤差」の列に、Ｄａおよびｐｐｍの単位で記入した。

[0082] （５－５．第１の標準物質および第２の標準物質に基づいた較正）

次に、本実施の形態に係る分析方法のもう一つの特徴である、第１の標準物質および第２の標準物質に基づいた較正を行なった。具体的にはアンギオテンシン２に対応すると判定された実測ｍ／ｚが１０４８．２１７のピークに対して、アンギオテンシン２の理論ｍ／ｚである１０４７．２を設定値として入力した。設定値とは、較正時に実測ｍ／ｚを近づける目標となる値である。本実施例では、分析装置１を用いて、較正時に標準物質の実測ｍ／ｚが、設定値の値となるように、マススペクトルのｍ／ｚを較正した。同様にして、アンギオテンシン１に対応すると判定された実測ｍ／ｚが１２９８．８０４のピークに対して、その理論ｍ／ｚである１２９７．５を設定値として入力した。

[0083] そして、試料由来の、対象物質の理論ｍ／ｚよりも大きい理論ｍ／ｚを有する第２の標準物質のピークとして、Ｅｒｗｉｎｉａ　ｐｅｒｓｉｃｉｎａの５０Ｓ　ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌ３４に対応すると判定された実測ｍ／ｚが５４１４．９３４のピークを選択した。そして選択されたピークに対して、その理論ｍ／ｚである５，４１０．３９を設定値として入力した。そして、分析装置１を用いて、第１の標準物質の設定値および第

２の標準物質の設定値に基づいて、マススペクトルを較正し、図６に示す較正後のマススペクトルを得た。

[0084] 図６は、本実施の形態に係る較正方法を実施した後のマススペクトルの一例を示す図である。図４と同様に、図６の下段には、ｍ／ｚ約１，０００から約６，０００の範囲のマススペクトルが示される。また、図６の上段には、ｍ／ｚ約１，８００から約２，０００の範囲のマススペクトルを拡大した図が示される。図６において、横軸は、ｍ／ｚに対応し、縦軸は信号強度の比率に対応する。また、各ピークの上方に付される数値はピークに対応するｍ／ｚを示す。また、Ｐ１１ＡおよびＰ１２Ａは、アンギオテンシン２およびアンギオテンシン１に対応するピークを示す。Ｐ１３Ａは、第２の標準物質である、Ｅｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａの５０Ｓ ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌ３４に対応するピークを示す。Ｐ１Ａ～Ｐ７Ａは、Ａｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎの７つの断片に対応するピークを示す。

[0085] 図７は、図６のマススペクトルが示す対象物質のｍ／ｚの誤差を示す表である。図７は、対象物質のｍ／ｚの誤差を算出するために用いられた。図５と同様に、Ｅｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａ Ａｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎの断片１～７に対応する情報が記入された。具体的には、図７の「アミノ酸配列」「理論ｍ／ｚ」「ピーク番号」の列には、図５と同じ値を記入した。図７の「実測ｍ／ｚ」の列には、較正された実測ｍ／ｚの値を記入した。そして、較正された実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの誤差を、「誤差」の列に記入した。

[0086] （５－６．本実施の形態に係る較正方法の効果の検証）

図４のマススペクトルと図５の表は第１標準物質および第２標準物質に基づく較正（図３）を行なう前のものであり、実施の形態に係る較正方法を適用していない場合とみなすことができる。この場合、予測したＡｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎ断片１～７の理論ｍ／ｚに対する実測ｍ／ｚの誤差は、１．４Ｄａ（８６０ｐｐｍ）以上であった。

[0087] これに対して、図６のマススペクトルと図７の表は第１標準物質および第２標準物質に基づく較正（図３）を行なった後のものであり、実施の形態に係る較正方法を適用した場合とみなすことができる。この場合、予測したＡｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎ断片１～７の理論ｍ／ｚに対する実測ｍ／ｚの誤差は、０．４３Ｄａ（２２０ｐｐｍ）以下であった。すなわち、較正後のマススペクトルにおいては、対象物質におけるｍ／ｚの誤差が大幅に低減していた。

[0088] 以上のように、想定されたＥｒｗｉｎｉａ ｐｅｒｓｉｃｉｎａのＡｃｉｄ Ｓｈｏｃｋ Ｐｒｏｔｅｉｎ断片に関して、実施の形態に係る較正方法を実行し、質量精度を向上することで、その想定の正しさをより高い精度で実証することができた。すなわち、本実施の形態に係る較正方法を実行することで、質量分析法を用いた微生物分子の分析を簡便に、より高い精度で実行することができた。

[0089] ［態様］

上述した複数の例示的な実施の形態は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

[0090] （第１項）一態様に係る較正方法は、分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正方法であって、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子を、第１の標準物質として添加した、微生物試料のマススペクトルを取得するステップと、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定するステップと、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質の理論ｍ／ｚとに基づいて、マススペクトルを較正するステップとを含む。

[0091] 第１項に記載の較正方法によれば、添加した対象物質より理論ｍ／ｚが小さい第１の標準物質と、微生物試料に由来する対象物質より理論ｍ／ｚが大きい第２の標準物質とを用いて、これらの標準物質において理論ｍ／ｚと実

測ｍ／ｚとの差が小さくなるようにマススペクトルを較正できる。これにより、対象物質の分子量が小さくても、当該分子量に対応する範囲のマススペクトルも適切に較正される。よって、マススペクトルにおける質量精度を向上することで、分析の精度を向上することができる。

[0092] （第２項）第１項に記載の較正方法において、較正するステップは、第１の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差の２乗と、第２の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの誤差の差の２乗との和が、小さくなるようにマススペクトルを較正するステップを含む。

[0093] 第２項に記載の較正方法によれば、簡易な計算により、第１の標準物質および第２の標準物質の双方において実測ｍ／ｚが理論ｍ／ｚに近づくように、マススペクトルを較正できる。すなわち、マススペクトルにおける対象物質に対応するｍ／ｚ範囲も簡易な計算により適切に較正される。

[0094] （第３項）第１項または第２項に記載の較正方法において、第１の標準物質は、タンパク質またはペプチドである。

[0095] 第３項に記載の較正方法によれば、分子量が既知のタンパク質またはペプチドの１つを、対象物質に応じて第１の標準物質として選択して、第１項に記載の較正方法を実行できる。

[0096] （第４項）第１～３項のいずれか１項に記載の較正方法において、第１の標準物質は、アンギオテンシン１、アンギオテンシン２、ブラジキニンフラグメント（１－７）、Ｐ１４Ｒ、ＡＣＴＨフラグメント（１８－３９）、酸化型インスリンＢ鎖の少なくとも１つを含む。

[0097] 第４項に記載の較正方法によれば、上記のような分子量の比較的小さな分子の少なくとも１つを、対象物質に応じて第１の標準物質として選択して、第１項に記載の較正方法を実行できる。

[0098] （第５項）第１～４項のいずれか１項に記載の較正方法において、第２の標準物質は、リボソームタンパク質を含む。

[0099] 微生物のリボソームタンパク質はＭＡＬＤＩで明瞭に観察される場合が多く、また、アミノ酸配列も多くの場合はＵｎｉＰｒｏｔなどの公開データベ

ースで調べることが可能であり、アミノ酸配列から分子量、さらに理論ｍ／ｚを算出することは容易である。よって、第５項に記載の較正方法によれば、リボソームタンパク質のこれらの特徴から、理論ｍ／ｚを容易に算出できる、第２の標準物質が簡便に設定できる。

[0100] （第６項）第１～５項のいずれか１項に記載の較正方法において、第２の標準物質の理論ｍ／ｚは、第２の標準物質のアミノ酸配列から推定される。

[0101] 第６項に記載の較正方法によれば、アミノ酸配列に基づいて、第２の標準物質の理論ｍ／ｚが簡便に算出できる。

[0102] （第７項）第１～５項のいずれか１項に記載の較正方法において、第２の標準物質の理論ｍ／ｚは、内部標準法を用いて事前に実測した第２の標準物質の実測ｍ／ｚに基づいて推定される。

[0103] 第７項に記載の較正方法によれば、内部標準法を用いて実測した実測ｍ／ｚは充分な精度である場合が多いので、このように第２の標準物質の理論ｍ／ｚを設定しても、その正確性は充分である場合が多い。この方法は、アミノ酸配列が不明な場合等、理論ｍ／ｚが算出できない場合に特に有用である。

[0104] （第８項）第１～７項のいずれか１項に記載の較正方法を用いて較正したマススペクトルに基づいて、対象物質を分析するステップをさらに含む分析方法。

[0105] 第８項に記載の較正方法によれば、分析の精度が向上した分析方法で、対象物質が分析できる。よって、より正確な分析結果が得られる。

[0106] （第９項）他の態様に係る制御装置は、分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正を実行する制御装置であって、メモリと、プロセッサとを備える。メモリは、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である第１の標準物質の理論ｍ／ｚを記憶する。プロセッサは、第１の標準物質を添加した微生物試料のマススペクトルを取得する。プロセッサは、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質と

して設定する。プロセッサは、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質とに基づいて、マススペクトルを較正する。

[0107] 第９項に記載の制御装置によれば、添加した対象物質より理論ｍ／ｚが小さい第１の標準物質と、微生物試料に由来する対象物質より理論ｍ／ｚが大きい第２の標準物質とを用いて、これらの標準物質において理論ｍ／ｚと実測ｍ／ｚとの差が小さくなるようにマススペクトルを較正できる。これにより、対象物質の分子量が小さくても、当該分子量に対応する範囲のマススペクトルも適切に較正される。よって、質量精度を向上することで、分析の精度を向上することができる。

[0108] （第１０項）他の態様に係る分析装置は、分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する分析装置であって、測定部と、メモリと、プロセッサとを備える。測定部は、微生物試料の測定データを取得する。メモリは、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である第１の標準物質の理論ｍ／ｚを記憶する。プロセッサは、第１の標準物質を添加した微生物試料のマススペクトルを測定データに基づいて取得する。プロセッサは、微生物試料に由来し、対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定する。プロセッサは、マススペクトル上のピークが示す第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび第２の標準物質とに基づいて、マススペクトルを較正する。

[0109] 第９項に記載の分析装置によれば、添加した対象物質より理論ｍ／ｚが小さい第１の標準物質と、微生物試料に由来する対象物質より理論ｍ／ｚが大きい第２の標準物質とを用いて、これらの標準物質において理論ｍ／ｚと実測ｍ／ｚとの差が小さくなるようにマススペクトルを較正できる。これにより、対象物質の分子量が小さくても、当該分子量に対応する範囲のマススペクトルも適切に較正される。よって、マススペクトルにおける質量精度を向

上することで、分析装置の分析の精度を向上することができる。

[0110] 今回開示された実施の形態はすべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は、上記した説明ではなく、請求の範囲によって示され、請求の範囲と均等の意味および範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

符号の説明

[0111] １　分析装置、１０　制御部、１１　処理部、１２　記憶部、１３　入出力部、１８　フラグメント、２０　測定部、２１　イオン化部、２２　イオン加速部、２３　質量分離部、２４　検出部、１１１　装置制御部、１１２　マススペクトル作成部、１１３　マススペクトル分析部、１１４　較正部、１３１　入力部、１３２　出力部、１３３　通信部、２２１　加速電極、２３１　フライトチューブ、Ｓ　イオン。

請求の範囲

[請求項1] 分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正方法であって、

前記対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子を、第１の標準物質として添加した、前記微生物試料のマススペクトルを取得するステップと、

前記微生物試料に由来し、前記対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定するステップと、

前記マススペクトル上のピークが示す前記第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび前記第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、前記第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび前記第２の標準物質の理論ｍ／ｚとに基づいて、前記マススペクトルを較正するステップとを含む、較正方法。

[請求項2] 前記較正するステップは、前記第１の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの差の２乗と、前記第２の標準物質における実測ｍ／ｚと理論ｍ／ｚとの誤差の差の２乗との和が、小さくなるように前記マススペクトルを較正するステップを含む、請求項１に記載の較正方法。

[請求項3] 前記第１の標準物質は、タンパク質またはペプチドである、請求項１または２に記載の較正方法。

[請求項4] 前記第１の標準物質は、アンギオテンシン１、アンギオテンシン２、ブラジキニンフラグメント（１－７）、Ｐ１４Ｒ、ＡＣＴＨフラグメント（１８－３９）、酸化型インスリンＢ鎖の少なくとも１つを含む、請求項１または２に記載の較正方法。

[請求項5] 前記第２の標準物質は、リボソームタンパク質を含む、請求項１または２に記載の較正方法。

[請求項6] 前記第２の標準物質の理論ｍ／ｚは、前記第２の標準物質のアミノ酸配列から推定される、請求項１または２に記載の較正方法。

[請求項7] 前記第２の標準物質の理論ｍ／ｚは、内部標準法を用いて事前に実測した前記第２の標準物質の実測ｍ／ｚに基づいて推定される、請求項１または２に記載の較正方法。

[請求項8] 請求項１または２に記載の較正方法を用いて較正したマススペクトルに基づいて、前記対象物質を分析するステップをさらに含む、分析方法。

[請求項9] 分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する際のマススペクトルの較正を実行する制御装置であって、

前記対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である第１の標準物質の理論ｍ／ｚを記憶するメモリと、

プロセッサとを備え、

前記プロセッサは、

前記第１の標準物質を添加した前記微生物試料のマススペクトルを取得し、

前記微生物試料に由来し、前記対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定し、

前記マススペクトル上のピークが示す前記第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび前記第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、前記第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび前記第２の標準物質とに基づいて、前記マススペクトルを較正する、制御装置。

[請求項10] 分析対象の分子である対象物質を含む微生物試料を質量分析する分析装置であって、

前記微生物試料の測定データを取得する測定部と、

前記対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが小さい１以上の分子である第１の標準物質の理論ｍ／ｚを記憶するメモリと、

プロセッサとを備え、

前記プロセッサは、

前記第１の標準物質を添加した前記微生物試料のマススペクトル

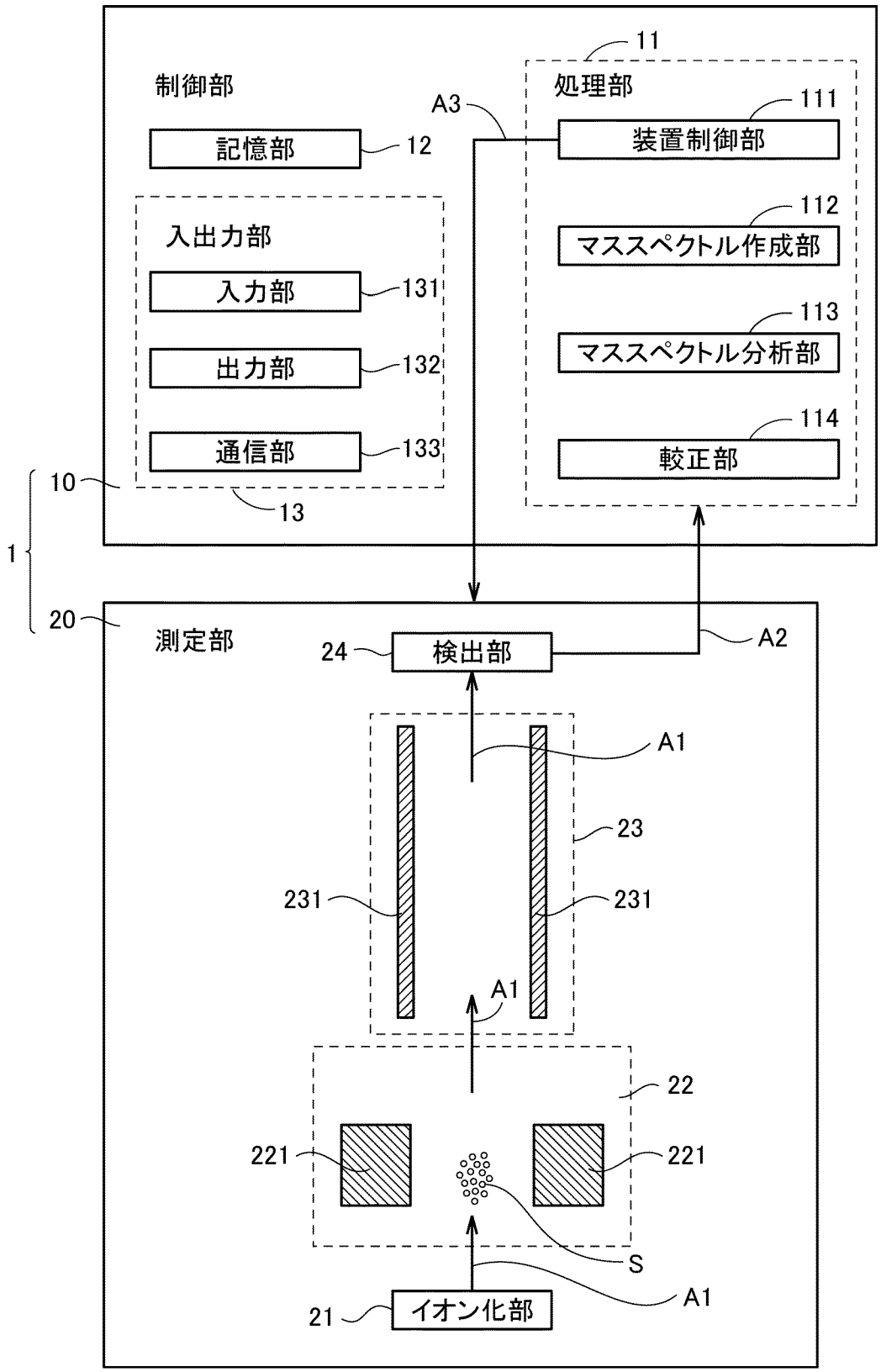
を前記測定データに基づいて取得し、

前記微生物試料に由来し、前記対象物質に比べ、推定される理論ｍ／ｚが大きい１以上の分子を、第２の標準物質として設定し、

前記マススペクトル上のピークが示す前記第１の標準物質の実測ｍ／ｚおよび前記第２の標準物質の実測ｍ／ｚと、前記第１の標準物質の理論ｍ／ｚおよび前記第２の標準物質とに基づいて、前記マススペクトルを較正する、分析装置。

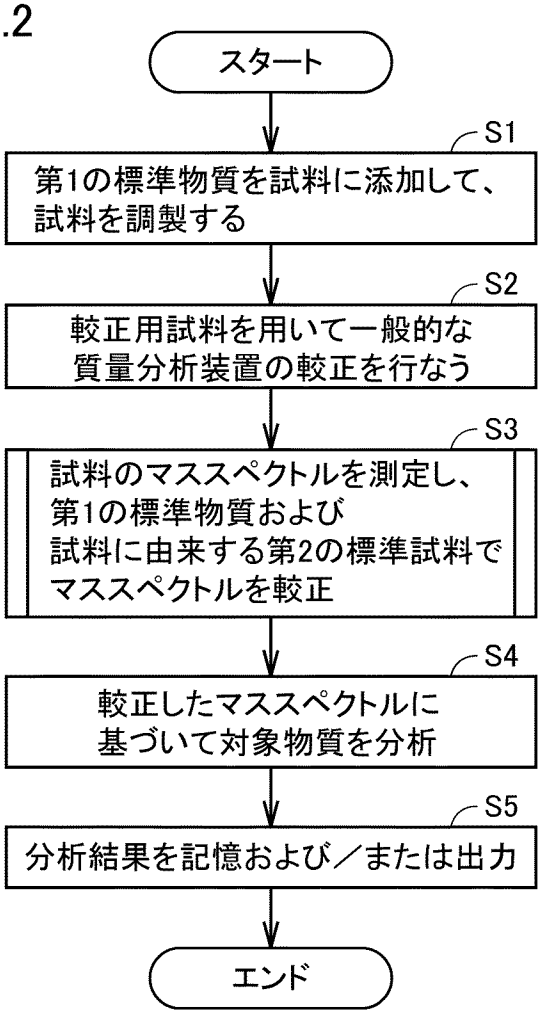
[図1]

FIG.1


制御部
記憶部
12
入出力部
入力部
131
出力部
132
通信部
133
13
10
1
20
11
処理部
A3
111
装置制御部
112
マススペクトル作成部
113
マススペクトル分析部
114
較正部
測定部
24
検出部
A2
A1
23
231
231
A1
22
221
221
S
A1
21
イオン化部

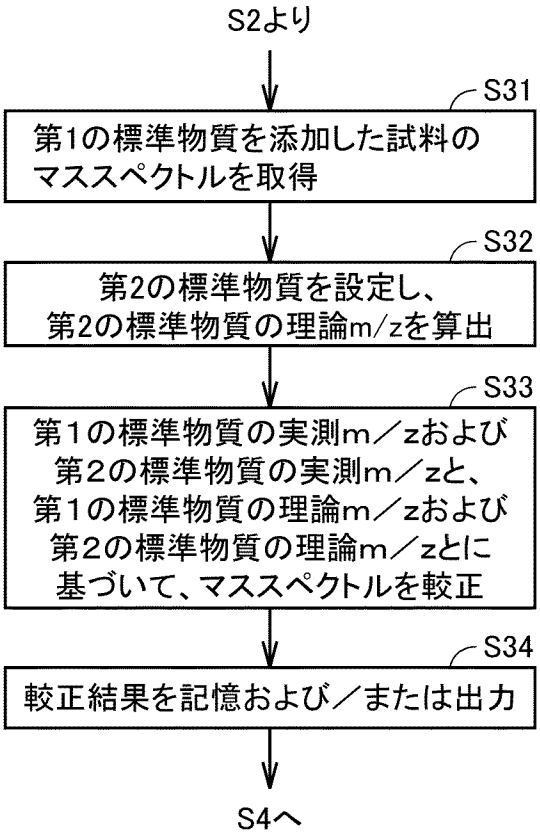
[図2]

FIG.2


スタート
S1
第1の標準物質を試料に添加して、
試料を調製する
S2
較正用試料を用いて一般的な
質量分析装置の較正を行なう
S3
試料のマススペクトルを測定し、
第1の標準物質および
試料に由来する第2の標準試料で
マススペクトルを較正
S4
較正したマススペクトルに
基づいて対象物質を分析
S5
分析結果を記憶および／または出力
エンド

[図3]

FIG.3


S2より
S31
第1の標準物質を添加した試料のマススペクトルを取得
S32
第2の標準物質を設定し、第2の標準物質の理論m/zを算出
S33
第1の標準物質の実測m／zおよび第2の標準物質の実測m／zと、第1の標準物質の理論m／zおよび第2の標準物質の理論m／zとに基づいて、マススペクトルを較正
S34
較正結果を記憶および／または出力
S4へ

[図4]

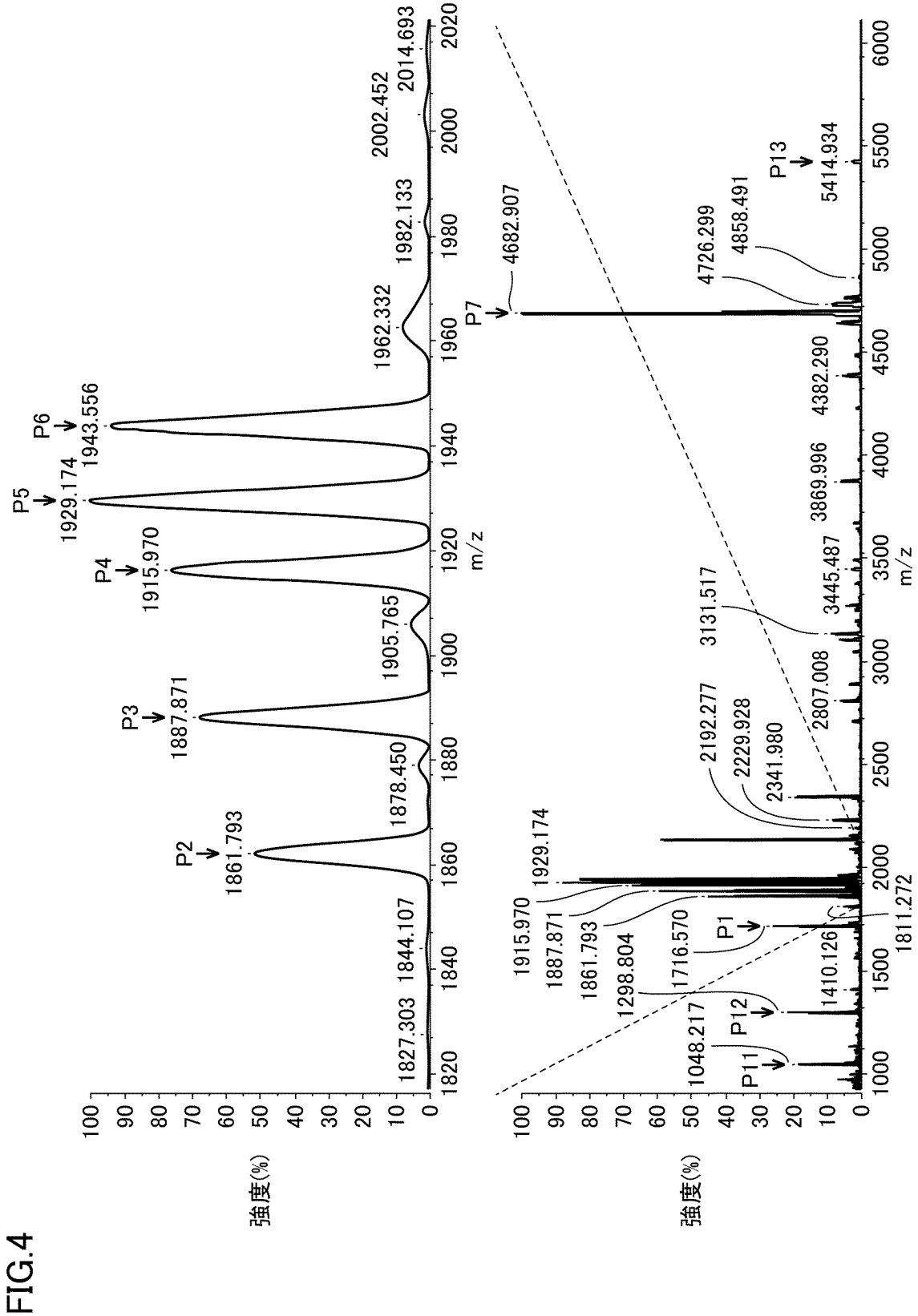

強度(%)
m/z
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P11
P12
P13
1827.303
1844.107
1861.793
1878.450
1887.871
1905.765
1915.970
1929.174
1943.556
1962.332
1982.133
2002.452
2014.693
1048.217
1298.804
1716.570
1410.126
1811.272
2192.277
2229.928
2341.980
2807.008
3131.517
3445.487
3869.996
4382.290
4682.907
4726.299
4858.491
5414.934

FIG.4

[図5]

FIG.5

断片番号	アミノ酸配列	理論m/z	ピーク番号	実測m/z	誤差	
					Da	ppm
1	AAKKHHKAVKKTAPKA	1715.09	P1	1716.570	1.480	860
2	AAKKHHKAKKAADQKAQ	1860.16	P2	1861.793	1.633	880
3	AAKKHHKAATKPAAQKAQ	1886.20	P3	1887.871	1.671	886
4	AAKKHHKAATKPVAQKAQ	1914.26	P4	1915.970	1.710	890
5	AAKKHHKAAKKPVAQNAQ	1927.26	P5	1929.174	1.914	990
6	AAKKHHKAAKKPVAQKAQ	1941.33	P6	1943.556	2.226	1,150
7	ADTTAAPAATAAPSAATTTTTAPAP AKASVKHTKHVKTHKKAAAQKAQ	4679.29	P7	4682.907	3.617	770

[図6]

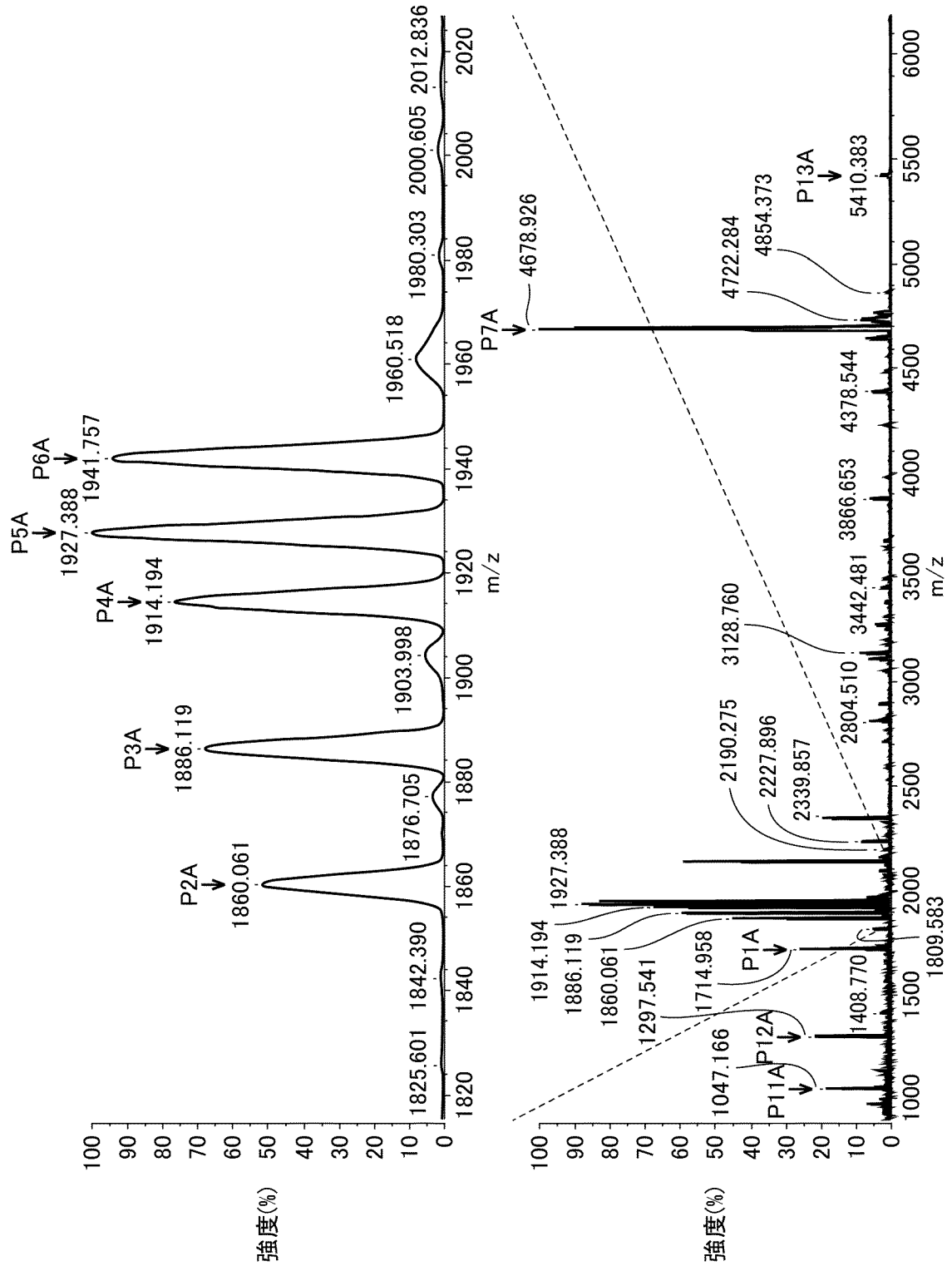

P5A
1927.388
P6A
1941.757
P4A
1914.194
P3A
1886.119
P2A
1860.061
1825.601
1842.390
1876.705
1903.998
1960.518
1980.303
2000.605
2012.836
強度(%)
m/z
P7A
4678.926
4722.284
4854.373
P13A
5410.383
4378.544
3866.653
3442.481
3128.760
2804.510
2190.275
2227.896
2339.857
1914.194
1927.388
1886.119
1860.061
1297.541
1714.958
P1A
1408.770
1809.583
1047.166
P12A
P11A

FIG.6

[図7]

FIG.7

断片番号	アミノ酸配列	理論m/z	ピーク番号	実測m/z	誤差	
					Da	ppm
1	AAKKHHKAVKKTAPKA	1715.09	P1A	1714.958	−0.132	80
2	AAKKHHKAKKAADQKAQ	1860.16	P2A	1860.061	−0.099	50
3	AAKKHHKAATKPAAQKAQ	1886.20	P3A	1886.119	−0.081	40
4	AAKKHHKAATKPVAQKAQ	1914.26	P4A	1914.194	−0.066	30
5	AAKKHHKAAKKPVAQNAQ	1927.26	P5A	1927.388	0.128	70
6	AAKKHHKAAKKPVAQKAQ	1941.33	P6A	1941.757	0.427	220
7	ADTTAAPAATAAPSAATTTTTAPAP AKASVKHTKHVKTHKKAAAQKAQ	4679.29	P7A	4678.926	−0.364	80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/62(2021.01)i; ***G01N 33/68***(2006.01)i
FI: G01N27/62 D; G01N27/62 V; G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/62; G01N33/48-33/98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-155344 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OFSCIENCE AND TECHNOLOGY) 21 June 2007 (2007-06-21) paragraphs [0001]-[0003], [0062]-[0064], [0077]	1, 3-10
Y		2
Y	JP 2005-292093 A (SHIMADZU CORP.) 20 October 2005 (2005-10-20) paragraph [0023]	2
A	JP 2021-520485 A (METABOLON, INC.) 19 August 2021 (2021-08-19)	1-10
A	JP 2014-235088 A (KOKURITSU IYAKUHIN SHOKUHIN EISEI KENKYUSHO) 15 December 2014 (2014-12-15)	1-10
A	WO 2020/066009 A1 (SHIMADZU CORP.) 02 April 2020 (2020-04-02)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 September 2023	**19 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/024120

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2007-155344 A	21 June 2007	(Family: none)	
JP 2005-292093 A	20 October 2005	(Family: none)	
JP 2021-520485 A	19 August 2021	US 2021/0148924 A1	
		WO 2019/195128 A1	
		EP 3775880 A1	
		CN 112136043 A	
		CA 3095403 A1	
JP 2014-235088 A	15 December 2014	(Family: none)	
WO 2020/066009 A1	02 April 2020	US 2022/0051885 A1	
		CN 112639458 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024120

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 27/62(2021.01)i; G01N 33/68(2006.01)i
FI: G01N27/62 D; G01N27/62 V; G01N33/68

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N27/62; G01N33/48-33/98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2007-155344 A (国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学) 21.06.2007 (2007-06-21) ［０００１］－［０００３］［００６２］－［００６４］［００７７］	1,3-10
Y		2
Y	JP 2005-292093 A (株式会社島津製作所) 20.10.2005 (2005-10-20) ［００２３］	2
A	JP 2021-520485 A (メタボロン，インコーポレイテッド) 19.08.2021 (2021-08-19)	1-10
A	JP 2014-235088 A (国立医薬品食品衛生研究所長) 15.12.2014 (2014-12-15)	1-10
A	WO 2020/066009 A1 (株式会社島津製作所) 02.04.2020 (2020-04-02)	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*　引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.09.2023	19.09.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
吉田　将志 2W 4636

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/024120

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2007-155344 A	21.06.2007	（ファミリーなし）	
JP 2005-292093 A	20.10.2005	（ファミリーなし）	
JP 2021-520485 A	19.08.2021	US 2021/0148924 A1	
		WO 2019/195128 A1	
		EP 3775880 A1	
		CN 112136043 A	
		CA 3095403 A1	
JP 2014-235088 A	15.12.2014	（ファミリーなし）	
WO 2020/066009 A1	02.04.2020	US 2022/0051885 A1	
		CN 112639458 A	